



RECEIVED

JUL 18 2002

TECH CENTER 1600/2900

1/19/1

011109751

WPI Acc No: 1997-087676/199709

XRAM Acc No: C97-028591

Identification of cyclo-oxygenase-1 inhibitors - by
incubation of potential inhibitors with DAMI cells, addn. of arachidonic
acid, and measurement of concn. of COX metabolic pathway prods. in cell
supernatant

Patent Assignee: NYCOMED AUSTRIA GMBH (NYCO-N); HAFSLUND NYCOMED PHARMA AG
(HAFS-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
AT 9600276	A	19961215	AT 96276	A	19960216	199709 B
AT 402732	B	19970615	AT 96276	A	19960216	199729

Priority Applications (No Type Date): AT 96276 A 19960216

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
AT 9600276	A		9	C12Q-001/18	
AT 402732	B			C12Q-001/18	Previous Publ. patent AT 9600276

Abstract (Basic): AT 9600276 A

Identification of substances which inhibit the enzyme
cyclo-oxygenase-1 (COX-1), and quantitative determin. of these
substances, comprises:

(a) incubation of potential COX-1 inhibitors with cells of the
human cell line DAMI (a megakaryocyte) or a subclone of this;

(b) addn. of arachidonic acid, and

(c) measurement of (i) the concn. of prostaglandin E2, thromboxane
B2 and/or other prods. of COX metabolic pathways, in the culture
supernatant, using a detection method suitable for eicosanoids and
prostaglandins, or (ii) measuring consumption of arachidonic acid.

USE - COX-1 catalyses, e.g. prodn. of prosta-cycline, which
protects gastric mucous cells from gastric acid. The process may be
used for the identification of cpds. which are inhibitors of COX-1, and
thus may give rise to side effects such as gastric mucous erosion. It
is useful in the identification of cpds. which are selective inhibitors
of COX-2 and thus may be used as antiinflammatory agents.

ADVANTAGE - The process is simple.

Dwg.0/0

Title Terms: IDENTIFY; CYCLO; OXYGENASE; INHIBIT; INCUBATE; POTENTIAL;
INHIBIT; CELL; ADD; ARACHIDONIC; ACID; MEASURE; CONCENTRATE; METABOLISM;
PATH; PRODUCT; CELL; SUPERNATANT

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12Q-001/18

International Patent Class (Additional): C12Q-001/26

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-H03; B04-M01; B11-C08E; B12-K04A; D05-H09

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M430 M782 M903 N102 P831 Q233 V754

Chemical Fragment Codes (M2):

02 H7 H723 J0 J011 J1 J171 M226 M231 M262 M281 M320 M416 M750 M903 M904
N102 Q233 R04038-A

03 G037 G553 H4 H402 H461 H481 H7 H722 H8 J0 J011 J1 J171 J5 J561 M280
M315 M322 M331 M332 M342 M372 M373 M391 M415 M510 M520 M530 M541
M750 M903 M904 M910 N102 Q233 V0 V622 R01233-A

04 F012 F013 F014 F016 F123 H4 H403 H422 H481 H7 H722 H8 J0 J011 J1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

*DialogWeb2of2

J171 M280 M315 M322 M331 M332 M342 M372 M373 M391 M413 M510 M521
M530 M540 M750 M903 M904 N102 Q233 R08238-A
05 H7 H723 J0 J011 J1 J171 M226 M231 M262 M281 M320 M416 M430 M782 M903
M904 N102 P831 Q233 R04038-D
06 G011 G100 J0 J012 J1 J131 J2 J241 M210 M211 M262 M281 M320 M414 M430
M510 M520 M531 M540 M782 M903 M904 M910 N102 P831 Q233 R00034-D
07 G011 G014 G100 H1 H102 H141 H6 H602 H608 H642 J0 J011 J1 M121 M143
M280 M311 M321 M342 M372 M391 M414 M430 M510 M520 M532 M540 M782
M903 M904 N102 P831 Q233 R03008-D
08 D014 D022 D601 G013 G100 H2 H211 H5 H541 H6 H602 H641 H8 J0 J012 J1
J171 J3 J331 M210 M211 M240 M272 M281 M311 M321 M342 M372 M391 M412
M430 M511 M520 M531 M540 M782 M903 M904 M910 N102 P831 Q233 R00076-D
Chemical Fragment Codes (M6):
09 M903 P616 Q233 R502 R515 R521 R614 R624 R627 R639
Derwent Registry Numbers: 0034-U; 0076-U; 1233-U
Specific Compound Numbers: R04038-A; R01233-A; R08238-A; R04038-D; R00034-D
; R03008-D; R00076-D

Derwent WPI (Dialog® File 351): (c) 2002 Thomson Derwent. All rights reserved.

© 2002 The Dialog Corporation plc

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(11) Nummer: **AT 402 732 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 276/96

(51) Int.Cl.⁶ : **C12Q 1/18**
C12Q 1/26

(22) Anmeldetag: 16. 2.1996

(42) Beginn der Patentdauer: 15.12.1996

(45) Ausgabetag: 25. 8.1997

(56) Entgegenhaltungen:

WD 90/02197A1, C.A. 107(1) 1987: 479R

(73) Patentinhaber:

NYCOMED AUSTRIA GMBH
A-4021 LINZ, OBERÖSTERREICH (AT).

(54) BENUTZUNG DER MENSCHLICHEN MEGAKARYOZYTENARTIGEN ZELLINIE DAMI ZUR IDENTIFIKATION UND BESTIMMUNG VON SUBSTANZEN ZUR HEMMUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT DES ENZYMS CYCLOOXYGENASE-1

(57) Verfahren zur Identifikation von Substanzen, die das Enzym Cyclooxygenase-1 hemmen, sowie zur quantitativen Bestimmung dieser Hemmung, unter Verwendung einer menschlichen, nicht gentechnologisch veränderten Zelllinie.

AT 402 732 B

Erfindungsgegenstand

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifikation von Substanzen, die das Enzym Cyclooxygenase-1 hemmen, sowie zur quantitativen Bestimmung dieser Hemmung, unter Verwendung einer menschlichen, nicht gentechnologisch veränderten Zelllinie.

Technologischer Hintergrund

Das Enzym Cyclooxygenase (COX) (Synonyme: Prostaglandinendoperoxid Synthase, EC 1.14.99.1, Prostaglandin H Synthase (PGHS), Prostaglandin Synthase (PGS)) wandelt Arachidonsäure in Prostaglandin H_2 um, welches dann von verschiedenen Enzymen zu den entsprechenden Prostaglandinen (z.B. PGE_2 , $PGF_{1\alpha}$), Prostacyclinen und Thromboxanen (z.B. TXA_2 , TXB_2) weiter verstoffwechselt wird (Thiemermann C., (1991), Eicosanoids 4, 187-202). Zwei Formen, d.h. Isoenzyme, der COX sind bisher beschrieben worden, die mit COX-1 und COX-2, bzw. PGHS-1 und PGHS-2 bezeichnet wurden. Diese beiden Isoenzyme werden durch zwei distinkte Gene unterschiedlicher Regulation codiert (Battistini et al., (1994), "COX-1 and COX-2: Toward the development of more selective NSAIDs", DNP 7, (8), 501-512; Smith et al., (1994), "Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isoenzymes-1 and -2", Annals New York Academy of Sciences 714, 136-142). So ist COX-1 permanent in vielen Zellen exprimiert und katalysiert z.B. die Bildung von Prostacyclin, das, sekretiert von Magenschleimhautzellen, diese vor der Magensäure schützt (Whittle et al. (1980), Nature 284, 271-273). Hingegen wird COX-2 erst auf inflammatorische Reize hin in Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten der Haut und anderen Zellen gebildet. Diese Reize erhöhen die Expression von COX-2 um das 10-80-fache (Smith et al., a.a.O.). Solche inflammatorische Reize sind proinflammatorische Cytokine, bakterielle Endotoxine *in vivo*, sowie Mitogene, Cytokine und Lipopolysaccharid (LPS) *in vitro*. Die dann sekretierten Mediatoren wie z.B. PGE_2 sind u.a. für das entzündliche Geschehen verantwortlich. Die Unterdrückung der Bildung dieser Mediatoren trägt im Wesentlichen zur Wirkung der nicht-steroidalen anti-inflammatorischen Substanzen (NSAIDs) bei. Die meisten NSAIDs hemmen die Aktivität beider COX Isoenzyme. Die Hemmung der COX-2 wird der anti-inflammatorischen Wirkung der NSAIDs zugeschrieben, während die Hemmung der COX-1 den Nebenwirkungen, wie z.B. Magenschleimhautreizungen, zugeschrieben wird. Zur Vermeidung dieser Nebenwirkungen der NSAIDs ist es bedeutsam, Medikamente zu entwickeln, die selektiv die Aktivität der COX-2 hemmen können (Wallace J.L. & Cirino G., (1994), "The development of gastrointestinal-sparing nonsteroidal anti-inflammatory drugs", TIPS 15, 405-406). Um dies zu erreichen, war es notwendig, Testsysteme zu entwickeln, die eine potentielle Hemmung der Aktivität der COX-1 durch potentielle Arzneistoffe erfassen können.

Tests zur Messung der COX-1 Aktivität wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Übersicht siehe Battistini et al., a.a.O.):

1. Gentechnische Verfahren zur Testung der murinen und human COX-1 Aktivität *in vitro*

Gentechnologische Verfahren beinhalten Expressionsvektoren des murinen und humanen COX-1 Gens. Diese wurden z.B. in COS-Zellen (African green monkey kidney cells) transfiziert und die entsprechenden Gene entweder stabil oder transient zur Expression gebracht. Danach werden diese Zellen zur Bestimmung der COX-1 Aktivität benutzt.

2. Nicht-gentechnologische Verfahren zur Testung der COX-1 Aktivität in nicht humanen Systemen *in vitro*

Nicht-gentechnologische Verfahren bedienen sich *ex vivo* boviner Endothelzellen oder muriner Zelllinien, wie z.B. NIH3T3 Zellen, die vorher mit Dexamethason behandelt wurden, um eine mögliche Expression des COX-2 Gens zu unterdrücken.

3. Nicht-gentechnologische Verfahren zur Testung der human COX-1 Aktivität *in vitro*

Zur Testung auf Inhibition der humanen COX-1 sind Verfahren beschrieben worden, die sich Thrombozyten bedienen, welche aus menschlichem Blut isoliert werden. Des weiteren sind Verfahren beschrieben worden, die die COX-1 Aktivität im menschlichen Blut direkt messen, ohne daß Thrombozyten isoliert werden müssen. Diese *ex vivo* Verfahren sind allerdings umständlich und zeitraubend und mit einer potentiellen Infektionsgefahr für das Laborpersonal verbunden.

Aufgabenstellung

Aufgrund der beschriebenen Nachteile ist es wünschenswert, ein Testsystem zur Verfügung zu haben, das möglichst einfach und verlässlich eine potentielle Hemmung der Aktivität der COX-1 durch potentielle
 5 Arzneistoffe erfassen kann. Besonders wünschenswert ist es, hierfür eine menschliche, gentechnologisch unveränderte Zelllinie verwenden zu können.

Überraschenderweise konnte diese Aufgabe durch die Bereitstellung eines Verfahrens zum Suchen nach und zur Charakterisierung und Bestimmung von Stoffen, die geeignet sind, die Aktivität des humanen COX-1 zu hemmen, gelöst werden. Dieses Verfahren verwendet die menschliche Megakaryozytenzelllinie
 10 DAMI (Greenberg et al., (1988)), welche COX-1 Enzymaktivität, aber keine Aktivität des Enzyms COX-2 aufweist.

Es handelt sich hierbei um ein nicht-gentechnologisches Verfahren.

Einen weiteren Vorteil stellt die Benutzung von Zelllinien, die per se COX-1 enthalten, dar, da das Isolieren von Zellen aus Blut, bzw. das Gewinnen von Blut überhaupt entfällt.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Identifikation von Substanzen, die das Enzym Cyclooxygenase-1 hemmen, sowie zur quantitativen Bestimmung dieser Hemmung, dadurch gekennzeichnet,
 20 net,

daß potentielle Hemmstoffe der Cyclooxygenase-1 mit Zellen der menschlichen Zelllinie DAMI oder mit einem Subklon derselben oder mit deren Lysaten inkubiert werden,

Arachidonsäure hinzugegeben wird und die Konzentration an Prostaglandin E₂ und/oder Thromboxan B₂ und/oder anderer Produkte des Cyclooxygenase-Stoffwechselweges im Kulturüberstand mittels einer geeigneten Detektionsmethode für Eicosanoide
 25 und Prostaglandine oder alternativ der Verbrauch an Arachidonsäure im Kulturüberstand gemessen wird.

In der menschlichen Megakaryozytenzelllinie DAMI wurde das Protein Cyclooxygenase-1 mittels zytoplasmatischer Immunfluoreszenz unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen COX-1 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der
 30 Proteine des Zelllysates und nachfolgender Westernblot Analyse unter Verwendung des oben genannten spezifischen Antikörpers gegen menschliches COX-1 vorgefunden. Des weiteren wurden die Produkte TXB₂, PGF_{1α} und PGE₂ des Stoffwechselweges der Cyclooxygenasen im Kulturüberstand dieser Zellen mittels ELISA (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA) nachgewiesen. Diese Befunde zeigen, daß das Enzym COX-1 in diesen Zellen vorhanden ist.

Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gerichtet gegen human COX-2, mittels zytoplasmatischer Immunfluoreszenz und mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese der Proteine des Zelllysates und nachfolgender Westernblot Analyse unter Verwendung des oben genannten spezifischen Antikörpers gegen
 35 menschliches COX-2 wurde das Vorhanden sein von COX-2 ausgeschlossen.

Beispiel

Zellen der menschlichen Megakaryozytenzelllinie DAMI werden in RPMI 1640, angereichert mit 10% FCS, 2 mM Glutamin, 10000 U/ml Penizillin, 10 ng/ml Streptomycin und 1 mM Pyruvat im Brutschrank bei
 45 37 °C, mit 5% CO₂ angereicherter Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Danach wird das Kulturmedium erneuert und potentielle Hemmstoffe der Cyclooxygenase-1, gelöst in Kulturmedium oder PBS oder einem anderen Zellkultur-verträglichen Lösungsmittel, hinzugefügt und 30 Minuten wie oben im Brutschrank inkubiert. Arachidonsäure wird hinzugegeben und 15 Minuten weiter inkubiert. Der Kulturüberstand der Zellen wird abgehoben und sein Gehalt an Produkten des Cyclooxygenasestoffwechsels mittels
 50 ELISA bestimmt.

50

55

AT 402 732 B

Hemmstoff	COX-1 Aktivität
Zellen allein	100%
Diclofenac	8,4%
Indomethacin	2,5%
Aspirin	88%
Flosulide	96,9%
100% COX-1 Aktivität entsprechen 1,8 ng/ml TXB ₂ . Alle Substanzen wurden mit 1 µmol/l getestet.	

Patentansprüche

- Ein Verfahren zur Identifikation von Substanzen, die das Enzym Cyclooxygenase-1 hemmen, sowie zur quantitativen Bestimmung dieser Hemmung, **dadurch gekennzeichnet**, daß potentielle Hemmstoffe der Cyclooxygenase-1 mit Zellen der menschlichen Zelllinie DAMI oder mit einem Subklon derselben oder mit deren Lysaten inkubiert werden, Arachidonsäure hinzugegeben wird und die Konzentration an Prostaglandin E₂ und/oder Thromboxan B₂ und/oder anderer Produkte des Cyclooxygenase-Stoffwechselweges im Kulturüberstand mittels einer geeigneten Detektionsmethode für Eicosanoide und Prostaglandine oder alternativ der Verbrauch an Arachidonsäure im Kulturüberstand gemessen wird.
- Ein Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß vor der Zugabe der potentiellen Hemmstoffe der Cyclooxygenase-1 Zellen der menschlichen Zelllinie DAMI oder eines Subklons derselben lysiert werden, Cyclooxygenase-1 mittels geeigneter biochemischer Aufreinigungsverfahren isoliert wird, diese in einem geeigneten Reaktionspuffer zu einem Reaktionsgemisch aufgenommen wird, und die weiteren Verfahrensschritte an dem Reaktionsgemisch vorgenommen werden.